

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Title of the Prior Art

Japanese Published Patent Application No. Hei.11-94791

Date of Publication: April 9, 1999

Concise Statement of Relevancy

Translation of column 2, lines 22-24

...a biosensor which is constructed such that a space is formed  
between the respective lead parts...

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11094791 A**(43) Date of publication of application: **09 . 04 . 99**

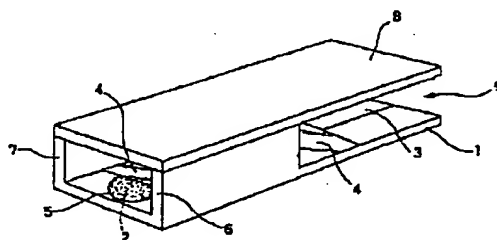
(51) Int. Cl.

**G01N 27/327**  
**G01N 27/30**(21) Application number: **09267814**(71) Applicant: **NOK CORP**(22) Date of filing: **12 . 09 . 97**(72) Inventor: **GOTO MASAO**(54) **BIOSENSOR**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To facilitate a production process and to reduce production cost in a biosensor wherein an acting electrode having oxidoreductase immobilized thereon and the opposed electrode thereof are arranged so as to take an opposed structure.

**SOLUTION:** In a biosensor wherein an acting electrode and the lead part thereof as well as an opposed electrode and the lead part thereof are respectively formed on two substrates and oxidoreductase is immobilized on the acting electrode, rising parts 6, 7 are provided to both side parts of the substrates excepting part corresponding to the lead part and used to bond both substrates. By this constitution, the acting electrode 2 and the opposed electrode 3 take an opposed structure and a space is formed between the respective lead parts.



COPYRIGHT: (C)1999,JPO

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-94791

(43)公開日 平成11年(1999)4月9日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

FI

G01N 27/327  
27/30

G01N 27/30

353F

Z

353R

353Z

審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全5頁)

(21)出願番号

特願平9-267814

(22)出願日

平成9年(1997)9月12日

(71)出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72)発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ

オーケー株式会社内

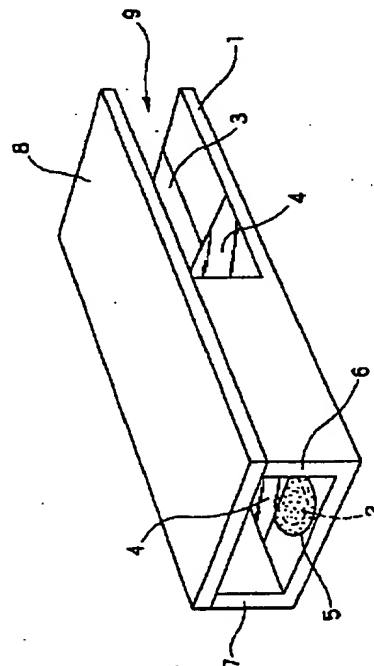
(74)代理人 弁理士 吉田 俊夫

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサにおいて、製作工程を容易化し、その製作コストを低減せしめたものを提供する。

【解決手段】 2枚の基板上に作用極とそのリード部および対極とそのリード部をそれぞれ形成させ、作用極上に酸化還元酵素を固定化せしめたバイオセンサにおいて、リード部対応部分を除く基板両側部に立上り部を設け、この立上り部を用いて両基板を接着させることにより、作用極と対極とが対面構造をとると共に、各リード部間に空間を形成せしめるように構成したバイオセンサ。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2枚の基板上に作用極とそのリード部および対極とそのリード部をそれぞれ形成させ、作用極上に酸化還元酵素を固定化せしめたバイオセンサにおいて、リード部対応部分を除く基板両側部に立上り部を設け、この立上り部を用いて両基板を接着させることにより、作用極と対極とが対面構造をとると共に、各リード部間に空間を形成せしめるように構成したバイオセンサ。

【請求項 2】 作用極部分の基板両側部に立上り部が設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 対極部分の基板両側部に立上り部が設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 作用極および対極部分の基板両側部に立上り部が設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項 5】 酸化還元酵素が電子伝達体との混合物層として形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項 6】 対極上にも酸化還元酵素が固定化された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項 7】 一方の基板上に、更に参照極とそのリード部とが設けられた請求項1記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化還元酵素を電極上に固定化したバイオセンサに関する。更に詳しくは、酸化還元酵素を電極上に固定化し、作用極と対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】グルコースオキシダーゼを作用極上に固定化せしめた従来のグルコースバイオセンサにあっては、作用極以外に対極あるいは対極と参照極とが平面状基板の同一面上に配置されている。このような電極配置のグルコースバイオセンサにおいて、測定サンプルを電極に接触させるには2つの方法がとられている。

【0003】その第1の方法は、直接測定サンプルを電極上に滴下する方法であるが、この方法ではサンプリングから滴下迄手間と時間を要するという問題がある。その第2の方法は、電極基板の上に溝を有するスペーサを配置し、その上に更に空気孔を設けたカバーを配置した構造のものをを用いるという方法である。この方法では、測定サンプルが直接電極上に導かれるため手間や時間がとられないという利点がある反面、空気孔の設置を必要とするなど、素子製作において煩雑な工程を必要とするという欠点を有している。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本出願人は先に、グルコースオキシダーゼを電極上に固定化せしめたグルコースバイオセンサであって、製作および測定が容易であり、従って使い捨てグルコースバイオセンサとし

て好適なものとして、作用極および対極とを対面構造をとるように配置し、より具体的には作用極を配置した基板と対極を配置した基板との間にスペーサを介在させることにより対面構造をとるように配置したものを提案している(特願平8-175585号)。

【0005】しかしながら、作用極-対極間の対面構造を実現するために、これらの電極を配置した基板の間にスペーサを介在させることは、製作工程が煩雑になるばかりではなく、コストアップにもつながるという問題がみられた。

【0006】本発明の目的は、酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサにおいて、製作工程を容易化し、その製作コストを低減せしめたものを提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、2枚の基板上に作用極とそのリード部および対極とそのリード部をそれぞれ形成させ、作用極上に酸化還元酵素を固定化せしめたバイオセンサにおいて、リード部対応部分を除く基板両側部に立上り部を設け、この立上り部を用いて両基板を接着させることにより、作用極と対極とが対面構造をとると共に、各リード部間に空間を形成せしめるように構成したバイオセンサによって達成される。

## 【0008】

【発明の実施の形態】図1は、本発明に係るバイオセンサの一態様を示す斜視図である。一方の基板1には、作用極2およびそのリード部3を含めた電極が一体として設けられており、電極の作用極2およびリード部3を除く部分には、熱硬化性ポリエステル樹脂等からなる絶縁膜4が被覆されている。作用極2部分には、酸化還元酵素5が固定化されている。

【0009】かかる基板のリード部対応部分を除く部分の基板両側部に立上り部6,7を設け、このような立上り部を設けていない対極側基板8と接着させることにより、作用極と対極とが対面構造をとるようにすると共に、各リード部間に空間9を形成させて、コネクタとの接続を容易ならしめる。また、対極側基板には、対極およびそのリード部を含めた電極が一体として設けられており、絶縁膜も同様に被覆され、対極部分には必要に応じて酸化還元酵素が固定化されている。

【0010】更に、基板両側部に設けられる立上り部は、作用極を設けた基板側だけ、対極を設けた基板側あるいはこれら両基板側に設けることができる。

【0011】基板としては、ポリエチレンテレフタレートによって代表されるプラスチック、生分解性プラスチック、ガラス、セラミックス、紙等の絶縁性基板であって、フィルム、シートまたは板状のものが用いられる。作用極、対極およびこれらのリード部の形成は、カーボン、銀、金等のペーストを用いるスクリーン印刷法ある



いはカーボン箔、パラジウム箔を用いる箔付け法などによって行われ、これらは不織布などによって研磨処理された上で用いられることが好ましい。更に、必要に応じて作用極側あるいは対極側の基板上に参照極を配置することもでき、参照極の形成は、スクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法などによって一旦銀電極を形成させた後、それを塩化銀化する方法などによって行われる。

【0012】固定化せしめる酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ等があり、これらによってグルコース、乳酸、アルコール、ビルビン酸、抗原等の有機物質、塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、水素イオン、溶存酸素等の電解質や無機物質の濃度測定が可能であるが、最も一般的に用いられるグルコースオキシダーゼによるグルコース濃度の測定法について、以下では塗布乾燥法(吸着法)を例にして説明することとする。なお、塗布乾燥法以外に、共有結合法、イオン結合法、架橋法などが、グルコースオキシダーゼの固定化方法として用いられる。

【0013】グルコースオキシダーゼは、一般には作用極上に固定化せしめるが、グルコースオキシダーゼは測定サンプルである水溶液中に溶解され、作用極上で反応するようになるため、作用極周辺、対極またはその周辺などに固定化させていてもよい。

【0014】グルコースオキシダーゼの電極への固定化、好ましくは作用極上への固定化は、以下に列举される如く、グルコースオキシダーゼ単体としてばかりではなく、電子伝達体(メディエータ)およびアルブミンの少なくとも一種を添加した混合物層としても形成される。

- (1) グルコースオキシダーゼ層
- (2) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体混合物層
- (3) グルコースオキシダーゼ-アルブミン混合物層
- (4) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体-アルブミン混合物層

【0015】グルコースオキシダーゼ層(1)の形成は、グルコースオキシダーゼ(GOD)を、例えば165800単位/gのGODの場合その約1~50mg、好ましくは約5~30mgを蒸留水またはクエン酸緩衝液(約0.05~0.2M濃度)1mlに溶解させ、その溶液(GOD溶液)約0.5~10 $\mu$ l、好ましくは約1~3 $\mu$ lを滴下法、スピンコート法などによって滴下し、室温で乾燥させて、膜厚約1~200 $\mu$ m、好ましくは約50~150 $\mu$ mの層を形成させることにより行われる。

【0016】混合物層(2)~(4)の場合にも、この場合と同様の形成方法が行われ、ただしGOD水溶液中に更に次の各成分が添加された溶液が用いられる。

混合物層(2)の場合：フェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン等が電子伝達体として用いられ、フェリシア

ン化カリウムにあつては約1~100mg、好ましくは約30~60mgを、パラベンゾキノンにあつては約1~200mg、好ましくは約50~150mgを更に添加した溶液を使用

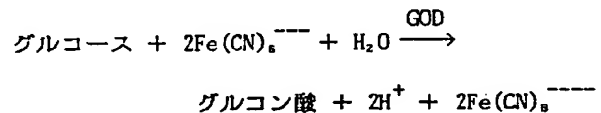
混合物層(3)の場合：牛血清アルブミンを約1~100mg、好ましくは約5~30mgを更に添加した溶液を使用

混合物層(4)の場合：混合物層(2)の形成に用いられた量の電子伝達体および混合物層(3)の形成に用いられた量の牛血清アルブミンを更に添加した溶液を使用

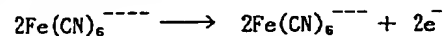
【0017】添加された電子伝達体は下記の如く作用し、またアルブミンやクエン酸緩衝液の添加は、測定液(グルコース水溶液)のpH変化に対して出力誤差を抑制し、バラツキのより少ない測定結果を与える。また、ノニオン系界面活性剤を電極付近に塗布することにより、測定液の吸引、それに引続く混合層の溶解に寄与し、測定精度を向上させるという効果も得られる。

【0018】グルコースがGODの作用により酵素の存在下で酸化されてグルコノラクトンを生成させ、そのとき発生するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を作用極上で酸化し、その際の酸化電流値を測定することにより、グルコース濃度を間接的に求める方法は周知である。しかしながら、測定液が水で希釈されない原液サンプルの場合には、酸化反応が溶存酸素濃度に律速されるため、グルコース濃度が約100mg/dl程度迄しか直線検量範囲を示さない。

【0019】そこで、溶液中濃度が有限である酸素の代わりに、電子伝達体がGODと共に用いられる。メディエータがフェリシアン化カリウムK<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>の場合、この反応は次のように進行する。



この際発生したフェロシアンイオンは、作用極で酸化されて酸化電流を生ずる。



【0020】また、メディエータとしてフェリシアン化カリウムの代わりにパラベンゾキノンを用いた場合には、GOD存在下でのグルコースとパラベンゾキノンとの反応でヒドロキノンが生成し、この際生成したヒドロキノンは作用極で酸化され、酸化電流を生ずるのでその値が測定される。



【0021】一方、対極上には、特に何も固定化しなくとも使用し得るが、アルブミンおよび電子伝達体の少なくとも一種からなる混合物層を形成させて用いてもよい。この場合には、作用極上のみに混合物層を設けた場合にみられる測定液による混合物層の溶解、拡散に生じ勝ちな傾きがみられなくなる利点があり、測定精度も上昇する。

【0022】なお、固定化せしめたGODへの測定サンプル液の接触を円滑に行わしめるために、作用極上、対極

上、作用極周辺、対極周辺、作用極上およびその周辺、対極上およびその周辺などに、ノニオン系界面活性剤を塗布したり、不織布、ロ紙等の含浸促進剤を間隙を利用して挟着させるなどの手段を適用することも可能である。

【0023】グルコース濃度の測定は、このようにして作製されたグルコースバイオセンサの両電極間に形成される空間に、所定濃度のグルコース水溶液約0.1~10 $\mu$ lを吸引して電極と接触させ、約1~120秒間程度反応させた後、そこに約0.05~1.5V、好ましくは約0.4~1.1Vの電圧を印加し、印加0.5~50秒後の電流値を測定するポテンシャルステップクロノアンペロメトリー法によって行われる。測定には、ポテンショガルバナスタットおよびファンクションジェネレータが用いられる。

#### 【0024】

【発明の効果】酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを、これらの各電極を内側に設けた各基板を基板立上り部を介して接着させることにより、対面構造をとるように配置した本発明のバイオセンサは、製作が容易であり、またその製作コストも低減される。

#### 【0025】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

#### 【0026】実施例1

(1)ポリエチレンテレフタレート製基板2枚を用意し、ここにカーボン製フィルム電極を貼付け、次いでこのような電極の各電極部およびそれらのリード部を除く部分に、熱硬化性ポリエステル樹脂製絶縁膜を被覆した。その一方の基板には、高さ200 $\mu$ mの立上り部がリード部対応部分を除く部分に設けられており、その立上り部を利用して2枚の基板が接着され、作用極と対極とを対面構造とすると共に、各リード間に空間を形成させた。

【0027】その一方のカーボン製電極上には、水1mlにグルコースオキシダーゼ(165800U/g)10mgおよびフェリシアン化カリウム48mgよりなる混合液(ドープ液)を1.5 $\mu$ l滴下して室温条件下で乾燥させたグルコースオキシダーゼ-フェリシアン化カリウム混合物層が予め形成されており、それを作用極とした。

【0028】(2)上記(1)の立上り部形成基板同志を接着させ(立上り部合計高さ400 $\mu$ m)、バイオセンサが作製された。この場合において、一方の電極上に混合物層が形成されている。

【0029】(3)上記(1)の立上り部形成基板同志を接着させ(立上り部合計高さ400 $\mu$ m)、バイオセンサが作製された。この場合において、両方の電極上に混合物層が形成されている。

【0030】これらのグルコースバイオセンサに、濃度250mg/dlのグルコース水溶液(pH5.0)1 $\mu$ lを吸引させ、2

0秒間静置した後、作用極-対極間に0.9Vの電圧を印加し、印加10秒後の電流値を10回測定した。測定には、ポテンショガルバナスタット(北斗電工製HA-501)およびファンクションジェネレータ(同社製HB-104)が用いられた。その測定値からCV値(平均値に対する標準偏差の割合)を算出すると、それぞれ(1)3.5%、(2)3.1%、(3)3.0%という値が得られた。なお、センサは、一試料毎に使い捨てとした。また、グルコース濃度を種々変更して測定を行ったところ、0~1000mg/dlの範囲内で直線性が得られた。

#### 【0031】実施例2

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液中にアルブミン10mgを添加したものが用いられた。CV値は、3.8%であった。

#### 【0032】実施例3

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液として水の代りに0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を用いて調製されたものが用いられた。CV値は、3.7%であった。

#### 20 【0033】実施例4

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液中にアルブミン10mgを添加すると共に、水の代りに0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を用いて調製されたものが用いられた。CV値は、3.6%であった。

#### 【0034】実施例5

実施例4で、ドープ液中に更にノニオン系界面活性剤(UC C社製品トリトンX-100)を0.5重量%の濃度で添加したものが用いられた。CV値は、3.5%であった。

#### 【0035】実施例6

30 実施例1の(1)で、界面活性剤(トリトンX-100)の0.5重量%水溶液を作用極の周辺に塗布し、乾燥させたものが用いられた。CV値は、3.4%であった。

【0036】なお、実施例2~6の各グルコースバイオセンサについても、グルコース濃度0~1000mg/dlの範囲内で直線性が得られた。

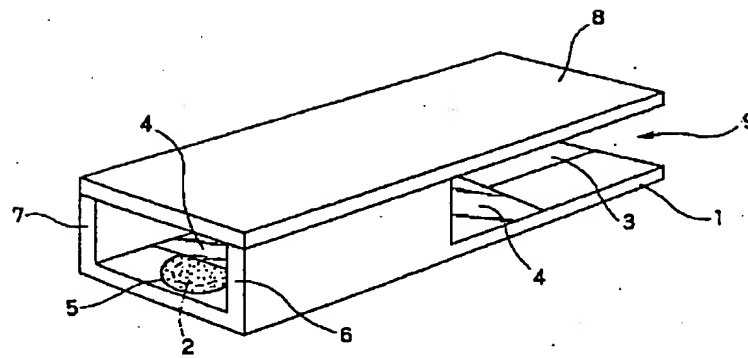
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るバイオセンサの一態様の斜視図である。

#### 【符号の説明】

- |     |          |
|-----|----------|
| 1   | 作用極側基板   |
| 2   | 作用極      |
| 3   | 作用極側リード部 |
| 4   | 絶縁膜      |
| 5   | 酸化還元酵素   |
| 6,7 | 立上り部     |
| 8   | 対極側基板    |
| 9   | 空間       |

【図 1】



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**